

Université du Québec

Mémoire présenté à  
l'Université du Québec à Trois-Rivières

Comme exigence partielle  
de la Maîtrise en Sciences de l'Environnement

Par  
Christian Brousseau B.Sc.

Utilisation des destruxines, toxines du champignon  
entomopathogène *Metarhizium anisopliae*, contre la tordeuse  
des bourgeons de l'épinette *Choristoneura fumiferana*  
Clemens, seules ou en présence de *Bacillus thuringiensis* var.  
*kurstaki*.

Août 1994

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

## **Remerciements.**

La réalisation de ce travail n'aurait pu avoir lieu sous sa forme actuelle sans l'apport de certaines personnes que je tiens à souligner.

Tout d'abord, mes remerciements et ma reconnaissance vont à mon directeur de recherches, le docteur Guy Charpentier, ainsi qu'à mon co-directeur, le docteur Serge Belloncik, pour leur soutien et leurs judicieux conseils qui m'ont permis de mener à bien ce travail.

Des remerciements sont également adressés au docteur Antoine Aubin pour son assistance au niveau de la réalisation et de l'interprétation des tests statistiques ainsi qu'au docteur Jacques Boisvert pour sa disponibilité et les multiples services rendus.

J'adresse de sincères remerciements au docteur Jean Lacoursière, chercheur-associé de l'Université de Lund, Suède, et professeur-associé à l'UQTR, ainsi qu'au docteur Alain Vey, chercheur INRA à la Station de Recherches de Pathologie Comparée de St-Christol-lez-Alès, France, pour leurs efforts déployés lors de la correction de cette thèse. Qu'ils soient assurés de l'importance que j'accorde à leur jugement.

Finalement, je voudrais remercier mes proches pour leur encouragement constant, et particulièrement ma compagne et candidate au Ph.D, Marie-Laure, pour son soutien tant affectif que scientifique tout au long de ces travaux.

## Problématique et Résumé

La tordeuse des bourgeons de l'épinette (TBE) *Choristoneura fumiferana* Clemens est un insecte économiquement très important au Québec. Ce ravageur est en fait le plus important défoliateur des forêts de conifères dans le nord-est de l'Amérique du Nord. Son impact se situe donc principalement au niveau forestier mais également de plus en plus au niveau récréo-touristique. On considère, seulement au Québec, que depuis un peu plus d'une vingtaine d'années que la TBE aurait détruit plus de 235 millions de m<sup>3</sup> de bois résineux, une quantité qui est comparable à celle de dix années de récolte.

Cet insecte, de l'ordre des Lépidoptères (Tortricidae), a un cycle de vie complet d'un an. Son développement comprend, à partir de l'oeuf, six stades larvaires, un stade chrysalide duquel émergera finalement l'adulte prêt à s'accoupler. C'est pendant les stades larvaires III, IV, V, et VI que l'insecte accomplit ses ravages. Les infestations de tordeuses semblent survenir périodiquement à intervalle d'environ 30 ans en s'attaquant principalement, dans l'ordre, au sapin baumier (*Abies balsamea*), à l'épinette blanche (*Picea glauca*), à l'épinette rouge (*Picea rubens*) ainsi qu'à l'épinette noire (*Picea mariana*).

Les premières infestations à être traitées à grande échelle au Québec le furent vers les années 50 avec un insecticide chimique organochloré, le dichloro-diphényl-trichlororéthane (DDT). Cet insecticide ayant une grande persistance et accumulation dans l'environnement ainsi qu'une toxicité importante pour les autres formes vivantes, son utilisation a été interdite au Canada contre la TBE

au début des années 1970. D'autres insecticides chimiques prirent la relève, tels les organophosphates et les carbamates. Cependant, ces insecticides chimiques répandus à grande échelle s'avérèrent eux aussi toxiques pour les organismes non cibles. Non seulement les insectes visés finissaient par devenir résistants mais les individus survivants à ces traitements étaient plus vigoureux, et leurs réserves énergétiques plus grandes. C'est pourquoi on s'intéressa sérieusement vers la fin des années 70 à l'utilisation à grande échelle d'un insecticide biologique, le *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (*B.t.k.*), une bactérie pathogène pour l'insecte, qui démontrait alors une efficacité comparable (sous certaines conditions) à celle des autres insecticides chimiques. Depuis quelques années au Québec, seul le *B.t.k.* est utilisé, sous différentes formulations commerciales (Thuricide®, Dipel®, Futura®, Biodart®,...), pour le traitement des zones infestées par la TBE.

Il a été démontré que la mortalité des larves de TBE soumises au *B.t.k.* survient à la suite d'une septicémie entérotoxique, et que l'action du bacille est fonction de l'état physiologique de l'insecte ainsi que des conditions ambiantes. L'effet insecticide du *B.t.k.* a été attribué aux inclusions cristallines parasporales synthétisées durant le cycle de sporulation de la bactérie. Celles-ci sont constituées par un ou plusieurs polypeptides de 130 à 140 kDa, désignés aussi par le terme  $\delta$ -endotoxine. Lorsque les inclusions sont ingérées par l'insecte, elles sont dissoutes dans l'environnement réducteur alcalin de l'intestin, en protoxines. Ces dernières sont par la suite converties par protéolyse en plus petits polypeptides toxiques, qui vont initier leur action en se liant avec une haute affinité à des récepteurs (glycoprotéines) sur l'épithélium de l'intestin moyen. Cette liaison va engendrer des

microlésions de la membrane cellulaire, qui affecteront la balance osmotique cellulaire, et par la suite causer le gonflement et la lyse des cellules.

Le principal avantage de l'utilisation des différentes souches de *B.t.* est leur remarquable spécificité pour certains insectes. Cette spécificité, qui rend l'utilisation du *B.t.* très sûre pour l'homme ainsi que pour les autres mammifères et la faune non-cible, a aussi l'avantage de ne pas affecté le potentiel naturel de contrôle des prédateurs et parasites des insectes visés. Ceci fait donc du *B.t.* un composant fort désirable pour les programmes de gestion intégrée des insectes nuisibles, par exemple. L'utilisation du *B.t.* a aussi l'avantage, jusqu'à présent, d'être beaucoup moins susceptible de provoquer le développement de résistances chez les insectes traités comparativement aux insecticides conventionnels. Il semblerait que cet avantage soit dû principalement à la grande complexité du mécanisme d'action de la ou des toxines de la bactérie qui nécessiterait, pour contrer l'action pathogène, plusieurs mutations génétiques importantes de la part de l'insecte.

Par contre, même une faible résistance d'apparition lente chez un insecte face au *B.t.* revêt un intérêt particulier, tout spécialement s'il s'agit d'un insecte économiquement important. Plusieurs espèces majeures ont récemment démontré leur capacité à s'adapter au *B.t.* en laboratoire. Parmi ceux-ci on retrouve principalement *Leptinotarsa decemlineata*, *Plodia interpunctella* et *Plutella xylostella*. Pour ce qui est des résistances sur le terrain on retient tout particulièrement le cas de *P. xylostella* qui a développé une forte résistance dans les champs traités régulièrement au *B.t.* à Hawaï, causant ainsi une augmentation

de la DI50 d'un facteur de 20. Pour la TBE, aucune résistance n'a été citée jusqu'à maintenant tant en laboratoire que sur le terrain, mais à la vue des quelques faits précédents on peut penser qu'avec l'usage répété et sans cesse grandissant du *B.t.k.* pour contrôler cet insecte, la résistance pourrait devenir un problème significatif à plus ou moins brève échéance. En ayant à l'esprit cette donnée, et compte tenu qu'il n'existe présentement sur le marché aucun insecticide biologique comparable au *B.t.k.* pour la TBE, nous en sommes venus à la conclusion qu'il était important de commencer à trouver des solutions afin d'empêcher ou gérer l'apparition possible de résistances de la TBE au *B.t.k.*. Les moyens simples et efficaces sont la rotation ou l'alternance de la toxine du *B.t.k.* avec d'autres toxines, insecticides, ou une stratégie de contrôle biologique, ou encore le mélange de toxines.

Notre laboratoire s'est intéressé particulièrement aux toxines de champignons entomopathogènes qui semblent une alternative valable aux insecticides chimiques. Parmi celles-ci, les toxines du deutéromycète *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok, principalement les destruxines, paraissent très prometteuses. Les destruxines sont des cyclodepsipeptides de poids moléculaire inférieur à 600 Da et possèdent le même squelette de 5 acides aminés ( $\beta$ -alanine, alanine, valine, isoleucine, proline) et un hydroxyacide. Celles-ci, testées sur plusieurs insectes appartenant à l'ordre des Diptères, Lépidoptères et Coléoptères, démontrent un large spectre d'activité ainsi qu'un niveau d'activité assez variable d'une espèce à l'autre. Les destruxines tout comme les cristaux de *B.t.* ne sont pas des toxines de contact, et doivent par conséquent être ingérées par l'insecte pour produire leur action. Les principaux tissus et organes cibles des

destruxines chez l'hôte sont le mésentéron, les tubes de Malpighi ainsi que le muscle. On retrouve également un effet immunodépresseur résultant d'une action sur les hémocytes. Peu de données sont disponibles concernant la toxicité des destruxines à l'égard des vertébrés, mais quelques tests effectués notamment sur des oeufs de *Brachydanio rerio* (Téléostéen, Cyprinidae) ainsi que sur des larves d'amphibiens (*Xenopus laevis*, *Rana temporaria*) n'ont pas montrés d'effet létal ou toxique marqué. De plus, des tests de toxicité chez la souris ont démontré un effet toxique modéré des destruxines comparativement à des insecticides chimiques traditionnels, et seulement lorsque celles-ci sont administrées par injection intrapéritonéale.

C'est pourquoi nous croyons que l'efficacité démontrée par les destruxines et leur spectre d'activité, incluant des insectes cibles appartenant notamment à l'ordre des Lépidoptères, laisse présager un certain potentiel de ces toxines pour lutter contre la TBE, soit seules, ou en alternance, ou encore en mélange avec la bactérie *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*.

L'objectif premier de notre travail était donc de déterminer si effectivement les mycotoxines du groupe des destruxines ont un certain potentiel en tant qu'insecticide actif sur la tordeuse des bourgeons de l'épinette *Choristoneura fumiferana*. On retrouve les résultats des travaux correspondant à cet objectif, et concernant aussi l'évaluation de l'effet des destruxines à long terme sur la croissance et le taux de mortalité des larves de cet insecte dans un premier article intitulé "Sensibilité de la tordeuse des bourgeons de l'épinette



(*Choristoneura fumiferana* Clemens) aux destruxines, mycotoxines de *Metarhizium anisopliae* " rédigé en conformité avec la revue "Journal of Invertebrate Pathology". Les conclusions de cette étude réalisée en laboratoire sur des larves de différents stades démontrent que les destruxines sont fortement pathogènes pour les larves de cet insecte (Figure 1, Tableau 1). Elles établissent de plus que les doses létales des destruxines augmentent de façon significative au cours des stades larvaires successifs, mais que cette différence ne dépend pas du stade évolutif de la larve en temps que tel mais bien de son poids corporel (Tableaux 1 et 2). Les conclusions illustrent bien également que les destruxines ont une influence négative sur la croissance des larves. Ceci est mis en évidence principalement par un allongement de la période larvaire, une réduction du poids des chrysalides et une diminution significative du pourcentage d'émergence des femelles (Figure 2, Tableaux 3 et 4). Ces actions qui ont un certain rapprochement avec ceux de substances du groupe des inhibiteurs de croissance permettent de présager un certain effet des destruxines sur le système hormonal de cet insecte.

Cette première étude permet donc, en plus de confirmer et renforcer l'intérêt des destruxines, d'avancer certaines hypothèses sur leur mode d'action et apporte des bases d'évaluation sur le potentiel de celles-ci pour le contrôle des populations de la TBE.

Dans un deuxième article intitulé "Effet de la combinaison du *Bacillus thuringiensis* et des destruxines, mycotoxines de *Metarhizium anisopliae*, sur la tordeuse des bourgeons de l'épinette (Lepidoptera: Tortricidae)", et dont la rédaction est conforme aux exigences de la

revue "Journal of Economic Entomology", on retrouve cette fois les résultats correspondant au deuxième objectif principal qui est de vérifier si la combinaison de destruxines à un insecticide biologique commercial, à base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, peut accroître l'efficacité de ce dernier (synergisme), et par le fait même en diminuer la quantité nécessaire pour lutter contre la tordeuse. Les expériences sont réalisées dans les mêmes conditions que celles des premiers travaux, mais cette fois uniquement avec des larves de *Choristoneura fumiferana* de cinquième stade. Les droites de régression dose-mortalité ont tout d'abord été établies individuellement pour les deux agents appliqués seuls, et utilisées par la suite comme base pour les bioessais combinés (Tableau 1). Cette étude démontre l'absence totale d'effet antagoniste entre les composés lors de la comparaison des taux de mortalité obtenus à ceux théoriquement attendus (action indépendante) pour dix combinaisons différentes entre le *B.t.k.* et les destruxines. De plus, dans sept cas de combinaison, la réponse observée est un synergisme de type supplémentaire (Tableau 2). Afin d'effectuer une meilleure analyse des résultats et également pour déterminer plus précisément le rôle de chacun des composés du mélange dans la mortalité finale, une modélisation, à partir des données acquises lors des tests combinés, a été réalisée en utilisant le modèle quadratique (Figure 1). Par la suite une équation simplifiée en a été extraite ( $R^2=0.99$ ) permettant ainsi d'évaluer la valeur de chacun des termes expliquant la relation entre les deux pathogènes (Tableau 3). Les conclusions de cette étude démontrent que les destruxines comme le *B.t.k.* contribuent au synergisme de ce système, et que l'application simultanée de ceux-ci

pourrait être un moyen efficace pour contrôler la population de *Choristoneura fumiferana* et pour diminuer la quantité de *B.t.k.* nécessaire. Ces conclusions établissent également l'utilité d'un tel modèle mathématique pour prédire en laboratoire, à partir de quelques essais de combinaisons préalables, les effets de la combinaison d'agents pathogènes, ainsi que pour évaluer la relation et le rôle de chacun des facteurs dans la mortalité observée.

L'ensemble des travaux effectués a permis de faire avancer les connaissances générales sur la toxicité et le mode d'action des destruxines chez les insectes. De plus, ils apportent particulièrement des renseignements sur les effets et sur l'efficacité de telles mycotoxines, utilisées seules ou en combinaison à un insecticide à base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, pour la TBE en laboratoire. Enfin, les résultats de ces travaux ouvrent également la porte à d'autres expériences telles que la combinaison des destruxines avec d'autres types de *B.t.*, ou encore avec des toxines, insecticides ou virus, pour différents insectes, et la vérification de l'efficacité des destruxines et du mélange destruxines-*B.t.k.* en condition de terrain sur le ravageur qu'est *Choristoneura fumiferana*.



**SENSIBILITÉ DE LA TORDEUSE DES BOURGEONS DE  
L'ÉPINETTE (*CHORISTONEURA FUMIFERANA* CLEMENS)  
AUX DESTRUXINES, MYCOTOXINES DE *METARHIZIUM*  
*ANISOPLIAE***

C. Brousseau<sup>1</sup>, G. Charpentier<sup>1\*</sup>, et S. Belloncik<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Département de Chimie-Biologie, Université du Québec à Trois-Rivières, C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7

<sup>2</sup> Centre de Recherche en Virologie, Institut Armand Frappier, Laval-des-Rapides, Québec, Canada, H7V 1B7

\* Chercheur à contacter pour toute correspondance

Titre abrégé: Sensibilité de *C. fumiferana* aux destruxines.

## RÉSUMÉ

La toxicité des destruxines, mycotoxines cyclodepsipeptidiques, a été étudiée en laboratoire chez le lépidoptère *Choristoneura fumiferana* Clemens. Les résultats de ces recherches démontrent que les destruxines sont fortement pathogènes pour les larves de cet insecte et les Doses Létales (DL 50 et DL 95) ont été à cet effet évaluées. Une augmentation significative des doses létales proportionnellement aux stades larvaires a été notée, cependant, cette différence disparaît lorsque les doses létales sont calculées par poids corporels moyens des larves. On remarque également une influence certaine des destruxines sur la croissance des larves intoxiquées par celles-ci. Il en résulte en fin de cycle une réduction du poids des chrysalides et une diminution significative du pourcentage d'émergence des femelles. Ces résultats permettent de considérer l'utilisation des destruxines pour le contrôle des populations de *Choristoneura fumiferana*.

**Mots Clés:** Tordeuse des bourgeons de l'épinette, *Choristoneura fumiferana*, champignon entomopathogène, *Metarhizium anisopliae*, destruxines, mycotoxines, contrôle biologique.

## INTRODUCTION

La tordeuse des bourgeons de l'épinette, *Choristoneura fumiferana* Clemens, est le plus grand défoliateur des forêts de conifères dans le nord-est de l'Amérique du Nord (Mattson *et al*, 1988). Au Québec depuis quelques années déjà seuls les insecticides biologiques à base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (*B.t.k.*) sont utilisés pour le traitement des zones infestées par cet insecte (Ministère des Forêts du Québec, 1993).

Cependant ces dernières années, plusieurs études, en laboratoire ainsi que dans les champs traités régulièrement, ont démontré l'apparition de résistance chez certains insectes aux toxines du *Bacillus thuringiensis* (McGaughey et Whalon, 1992). On peut donc s'attendre à ce que la résistance des insectes devienne un problème significatif avec l'augmentation de l'utilisation des produits à base de *B.t.*. Dans le cas de la tordeuse des bourgeons de l'épinette, même si aucune résistance n'a été citée jusqu'à maintenant, l'apparition de résistance chez certains lépidoptères combinée au fait de l'utilisation sans cesse grandissante du *B.t.k.* sur nos forêts, ne nous permet pas d'écarter cette possibilité à plus ou moins long terme. De plus, l'absence sur le marché d'insecticide biologique alternatif valable à celui-ci fait qu'il est primordial, à notre avis, de trouver d'autres moyens pour continuer à lutter efficacement contre la tordeuse.



Parmi les microorganismes pathogènes de la tordeuse des bourgeons de l'épinette, on note, outre la bactérie *Bacillus thuringiensis*, une quinzaine d'espèces comprises dans les groupes des virus, des champignons ainsi que des protozoaires (microsporidies) (Fleming, 1985). Chacun de ces organismes varie dans son mode d'infection, site de replication, et mécanisme de pathogénicité. De toutes ces infections, ce sont les champignons ainsi que les microsporidies qui sont les plus souvent responsables de pathologies dans la nature et par conséquents désignés comme étant les pathogènes les plus importants pour la lutte biologique (Fleming, 1985; Mattson *et al*, 1988).

Dans la gamme des champignons entomopathogènes, on retrouve le deutéromycète *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Ce dernier produit des toxines, appelées destruxines, qui sont des cyclodepsipeptides composés d'un squelette de cinq acides aminés et d'un D- $\alpha$ -hydroxy acide (Roberts, 1981). Il est généralement accepté que ces toxines jouent un rôle important dans le déroulement de la pathogénèse du champignon, pouvant même causer la mort de l'hôte (Roberts, 1981; Vey *et al*, 1987; Vey et Quiot, 1989). De plus, les destruxines possèdent une bonne toxicité sur un large spectre d'insectes cibles (Fargues et Robert, 1986; Roberts, 1981) et semblent pouvoir être une alternative valable aux insecticides chimiques (Roberts, 1981). Ces toxines, qui par ailleurs ont une action qui présente des traits communs à celle de la toxine du *B.t.* (Vey *et al*, 1987), nous ont semblé être très intéressantes à étudier pour le contrôle de *Choristoneura fumiferana*.

Ainsi, cet article vise à déterminer si les mycotoxines du groupe des destruxines ont effectivement un certain potentiel de toxicité sur la tordeuse des bourgeons de l'épinette *Choristoneura fumiferana*, et quel en est leur effet sur la croissance de ces dernières.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### *Insecte:*

L'insecte hôte, *Choristoneura fumiferana*, qui sera utilisé pour les différents tests *in vivo*, provient de l'Institut pour la Répression des Ravageurs Forestiers (IRRF) du Service Canadien des Forêts à Sault Ste-Marie, Ontario (Canada). Les larves, reçues au deuxième stade en état de diapause, sont élevées à l'intérieur de chambres environnementales selon les directives de l'IRRF (24°C, 60% humidité, photopériode: 16/8) dans des petits contenants sur diète artificielle (Grisdale et Wilson, 1988) mais sans antibiotique.

### *Destruxines:*

Nous avons utilisé pour les tests de toxicologie un extrait brut de destruxines sous forme cristallisées. Celui-ci, enregistré sous la référence M.T.C. 2074A, provient de la Station de Recherches de Pathologie Comparée INRA/CNRS de St-Christol-lez-Alès, France. La fermentation et préparation de cet extrait brut ont été réalisées, à partir de la souche Ma.120 de *M. anisopliae*, à l'Institut de chimie des substances naturelles - CNRS de Gif-sur-Yvette (France) par A. Escaut. L'extrait brut est mis en solution dans de l'acétone à raison de 0.1 ml d'acétone pour 7 mg de toxine et dilué avec de l'eau distillée déminéralisée.

### *Tests toxicologiques:*

Les tests *in vivo* sont effectués sur des larves de troisième, quatrième et cinquième stade (McGugan, 1954). La méthode

expérimentale que nous avons utilisée est une adaptation de la technique conventionnelle d'étalement sur diète artificielle (Dulmage *et al*, 1976) et de la technique de dosage élaborée par Moore et Morris (1982). Elle consiste à déposer sur des petits cubes de diète ( $0.125 \text{ mm}^3$  de volume pour les larves de stade III et  $1 \text{ mm}^3$  pour les stades IV et V), chacun contenu dans un puits, un inoculum de  $2 \text{ } \mu\text{l}$  pour les larves de stade III et  $3 \text{ } \mu\text{l}$  pour les stades IV et V d'une dilution donnée de destruxines. Pour les témoins, on dépose une solution d'eau distillée déminéralisée et d'acétone aux mêmes concentrations que pour la solution de destruxines correspondante. Les puits utilisés sont ceux des plaques de culture de cellules à 96 unités pour les larves de stade III et IV, et à 24 unités pour le stade V. Une fois l'inoculum absorbé, les larves de stade choisi sont déposées une à une dans les puits et ces derniers refermés à l'aide des couvercles. Les plaques sont ensuite entourées de gazes humidifiées, pour maintenir une humidité relative près de 100%, et placées dans une chambre environnementale aux mêmes conditions que l'élevage pendant 72 heures. Après ce délai, la mortalité de chaque insecte est vérifiée et tous les survivants ayant consommé la totalité de la dose sont placés sur diète artificielle saine et observés pendant 14 jours supplémentaires. Les insectes morts après consommation d'une dose partielle sont inclus dans les relevés sous la présomption que ces insectes seraient morts s'ils avaient consommé toute la dose.

Pour un bioessai, un minimum de quatre concentrations différentes sont testées, chacune individuellement sur une quarantaine de larves. Avant chaque expérience, un échantillon de 20 larves est prélevé du lot utilisé, les individus sont pesés et leurs

capsules céphaliques mesurées afin de déterminer leur stade pour l'obtention de la plus grande homogénéité possible entre les réplicats. Toutes les expériences sont reprises aux moins trois fois.

L'analyse des résultats (doses létales) se fait par la méthode probit (Finney, 1971). Chaque réplicat d'un bioessai est analysé individuellement et par la suite groupé tel que recommandé par Finney (1971). Les proportions de réponses dans les bioessais sont corrigées pour la mortalité dans les témoins par la formule d'Abbott (Abbott, 1925). Les différents groupes sont par la suite comparés en utilisant le test statistique Chi-deux de Pearson, le test de parallélisme ainsi que par la comparaison des potentiels relatifs moyens (SPSS-X, 1986).

#### *Tests de croissance:*

Selon la même technique décrite précédemment, nous avons procédé au traitement de 3 lots de 50 larves de stade III avec 0 (témoin) et 0.1  $\mu\text{g}$  par larve. Le stade de chacun des individus (III, IV, V, VI, chrysalide) a été relevé périodiquement et les résultats ont été soumis à une analyse probit afin de déterminer le temps pris par 50% des larves pour atteindre, à partir du temps zéro (première larve du lot à passer au stade IV), chacun des stades.

La mortalité des larves ainsi que le poids, le sexe et le taux d'émergence des chrysalides ont également été notés et soumis à une analyse de variance.

## RÉSULTATS

Les tests avec les destruxines ont démontré une toxicité évidente pour les larves de troisième, quatrième et cinquième stade de *Choristoneura fumiferana*. Les droites obtenues par l'analyse probit des mortalités en fonction du logarithme de la dose sont représentées à la figure 1. Les doses létales 50 et 95 correspondantes sont respectivement de 0.116 et 0.414  $\mu\text{g/larve}$  pour le stade III; 0.350 et 1.033  $\mu\text{g/larve}$  pour le stade IV ainsi que 1.520 et 4.093  $\mu\text{g/larve}$  pour le stade V. Ces résultats, accompagnés de leurs intervalles de confiance 95% ainsi que la pente de la droite, pour les différents stades larvaires, sont indiqués au tableau 1. Les doses létales 50 et 95 augmentent avec l'évolution pondérale des larves sans qu'il n'y ait aucun chevauchement de leur intervalle de confiance respectif. Lorsque les données des trois stades sont regroupées et comparées, l'hypothèse d'une droite commune de régression est statistiquement inacceptable. Il nous apparaît donc clair que les doses létales des destruxines augmentent de façon importante au cours des stades larvaires successifs chez cet insecte. Au niveau des pentes des droites, on observe une légère augmentation de celles-ci en fonction du stade larvaire, mais compte tenu du fait que les erreurs standards des pentes du stade III et IV ainsi que du stade IV et V se chevauchent et que dans ce dernier cas la probabilité du test de parallélisme est non-significative ( $P > 0.05$ ), on ne peut accorder trop d'importance à cette observation.

Les doses utilisées pour ces tests toxicologiques ont été par la suite transformées en fonction du poids larvaire moyen de chaque stade ( $\mu\text{g}$  de toxines/mg de poids corporel des larves). L'analyse probit démontre cette fois des doses létales semblables d'un stade à l'autre avec des intervalles de confiance qui se chevauchent (tableau 2). Il semblerait donc que la sensibilité des larves de *C. fumiferana* ne dépende pas du stade larvaire atteint mais bien de la masse corporelle de chacune d'entre elles au moment du traitement.

L'observation des survivants qui ont consommé la totalité de la dose lors des tests de toxicité, et qui ont été placés sur diète artificielle saine par la suite n'a pas permis de mettre en évidence une différence entre les individus traités et les témoins sur une période de 14 jours suivant le contact avec les destruxines (non illustré). Certaines larves soumises aux destruxines peuvent donc, tout comme dans le cas du *B.t.k.* (Fast et Dimond, 1984), se rétablir si elles sont par la suite nourries avec de la diète saine. De plus, les destruxines ne semblent pas provoquer d'effet phagodépresseur très important sur les larves de *C. fumiferana*, puisque même à de fortes concentrations la majorité des individus paraissent se nourrir par la suite de façon normale. Cette observation est en accord avec les résultats obtenus par Fargues et Robert (1986) lors de l'étude des effets de la destruxine E sur la consommation des larves de *Spodoptera littoralis* Boisduval. Cependant, il nous a semblé observer un certain retard dans la croissance des lots de larves traitées à de moyennes et fortes concentrations de destruxines. C'est pourquoi il est apparu nécessaire de vérifier, à partir de larves de stade III, si effectivement il y avait

sur une longue période une influence des destruxines sur la croissance des larves ainsi que sur le taux de mortalité de celles-ci. Pour se faire, une dose de destruxines provoquant une mortalité de l'ordre de 50% (0.1  $\mu$ g/larve) a été utilisée, et les larves, traitées de la même façon que lors des tests toxicologiques, suivies sur une période de 50 jours (figure 2).

Nous avons noté une augmentation significative de la période larvaire chez les insectes soumis aux destruxines par comparaison avec celle des témoins (tableau 3 et figure 2). Le retard dans le développement des larves traitées a été enregistré dès le stade IV et le prolongement mesuré de la période pour atteindre un stade quelconque (IV, V, VI ou chrysalide) de l'évolution de l'insecte oscille entre +8,6% et +23% de la normale. La mortalité des larves au cours de cet essai, mis à part la mortalité initiale dans les premières 72 heures, est de 11% supérieure chez les lots soumis aux destruxines, cette différence n'est cependant pas significative (tableau 4).

Au stade nymphal, l'effet des destruxines se fait sentir principalement par une perte de poids des chrysalides (tableau 4). Celle-ci est de l'ordre de -10,2% chez les mâles et de -19,9% chez les femelles. On remarque que les femelles semblent beaucoup plus affectées par les destruxines que les mâles, car en plus d'une perte de poids significative, du double de celle des mâles, on observe une diminution importante du taux d'émergence de celles-ci (-19,5%) comparativement aux témoins femelles (tableau 4).



## DISCUSSION

Il est difficile de comparer les résultats de nos tests toxicologiques avec ceux obtenus par d'autres auteurs, car d'une part, dans la plupart des cas le mode de traitement des insectes est l'injection intracoelomique, et les essais réalisés par ingestion libre ou forcée le sont avec un ou quelques composés purifiés. De plus, on constate également pour une destruxine donnée des sensibilités qui varient considérablement d'une espèce d'insecte à l'autre (Fargues et Robert, 1986; Roberts 1981). D'autre part, peu de ces recherches sont réalisées simultanément sur différents stades larvaires (Fargues et Robert, 1986). À titre indicatif, nous pouvons cependant mentionner les expériences de Fargues *et al.* (1986) sur l'ingestion forcée de destruxines purifiées sur le lépidoptère *Galleria mellonella* (stade 7), ces résultats donnant des doses létales 50 et 90 après 96h respectivement de 0.033 et 0.181  $\mu\text{g}/\text{mg}$  pour la destruxine E et de 0.181 et 0.752  $\mu\text{g}/\text{mg}$  pour la destruxine B. En considérant que le type d'ingestion que nous avons utilisé est l'ingestion libre et que nous avons employé un extrait brut de destruxines et non une destruxine purifiée, nos résultats de 0.097  $\mu\text{g}/\text{mg}$  pour la dose létale 50 et de 0.297  $\mu\text{g}/\text{mg}$  pour la dose létale 90 après seulement 72h au lieu de 96h tendent à confirmer que *C. fumiferana* a une sensibilité élevée face aux destruxines, ou du moins, comparable à celle observée chez d'autres lépidoptères.

Il a été démontré par d'autres auteurs que les destruxines, administrées par ingestion forcée ou ingestion libre, provoquent chez l'insecte un effet cytotoxique précoce principalement au niveau du

mésentéron (Vey *et al.*, 1987; Vey et Quiot, 1989). Parallèlement, on observe lorsque les destruxines sont administrées par injection intracoelomique chez le lépidoptère *Galleria mellonella* une paralysie tétanique immédiate réversible (Roberts, 1981). Cette paralysie serait attribuable à l'effet potentiel des destruxines sur des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  endogènes provoquant la dépolarisation des muscles (Samuels *et al.*, 1988). De plus, selon ce même mode d'administration on note une détoxification rapide des destruxines par l'organisme de l'insecte, celle-ci serait responsable entre autre de la réversibilité de la paralysie tétanique (Jegorov *et al.*, 1992; Lange *et al.*, 1991). Il est donc possible que la mortalité rapide observée chez l'insecte soit causée principalement par l'attaque initiale des toxines au niveau de l'intestin en créant une perturbation de la balance ionique, un peu à la manière des toxines protéiques du *B.t.* (McGaughey et Whalon, 1992). Lorsque que cette attaque initiale est importante, elle serait alors principalement responsable de la mort de l'insecte, et lorsque que celle-ci serait moins importante, il y aurait alors détoxification rapide des toxines par l'organisme et possibilité de survie pour l'insecte. Cette hypothèse expliquerait entre autre l'observation que certaines larves qui ont consommé les destruxines puissent se rétablir lorsque qu'elles sont par la suite déposées sur diète artificielle non toxique.

Pour ce qui est des effets observés des destruxines sur la croissance des larves de *C. fumiferana*, il s'avère à la vue des résultats que ces mycotoxines possèdent, outre une bonne toxicité, une influence certaine sur la croissance des larves de cet insecte. On remarque par ailleurs un certain rapprochement des effets observés

de celles-ci avec ceux d'autres substances faisant partie du groupe des inhibiteurs de croissance (Retnakaran *et al.*, 1985). Les destruxines s'en distinguent cependant principalement par une mortalité initiale importante et rapide des insectes ainsi que par des déficiences morphogéniques moins marquées. Néanmoins, compte tenu du fait qu'en plus d'occasionner un allongement de la période larvaire il y a une sensibilité plus élevée des chrysalides femelles que des mâles, l'hypothèse d'un certain effet des destruxines sur le système hormonal pourrait être envisagée. Celles-ci pourraient agir directement sur un des sites de production et/ou de contrôle de la production des hormones tel le cerveau, les *corpora cardiaca* et *corpora allata*, les glandes de mues, le transport axonique des influx, etc., ou encore sur les hormones elles-mêmes (ecdysone et hormone juvénile) ou sur leur transport dans l'hémolymph. Elles pourraient aussi intervenir indirectement, sous forme d'un retard de croissance causé par le stress physiologique subi par l'insecte du fait de dommages provoqués par les destruxines au niveau de certains organes comme le mésentéron et les tubes de Malpighi. De plus, comme l'ecdysone et l'hormone juvénile sont des hormones à double fonction, impliquées aussi bien dans la régulation de la reproduction que dans le développement larvaire (Retnakaran *et al.*, 1985), une action directe ou indirecte sur celles-ci par les destruxines pourrait entraîner, en plus des effets déjà observés, une diminution de la fécondité des femelles, de la quantité et/ou viabilité des oeufs.

Beaucoup de travaux restent à faire sur le mode d'action des destruxines, tant sur leur attaque initiale au niveau de l'intestin et de

leur pénétration dans l'organisme que sur leur effet et leur rôle à long terme sur la croissance, la fécondité et la mortalité des insectes. Le rôle possible sur les hormones et la croissance des métabolites secondaires générés lors des processus de détoxification des destruxines, qui sans avoir d'action toxique pourraient agir à ces niveaux, serait également à vérifier. Finalement, la toxicité des destruxines sur la faune non-cible et les vertébrés reste aussi à être mieux étudiée.

Quoi qu'il en soit, ces résultats confirment et renforcent l'intérêt des destruxines en tant qu'insecticide de nouvelle génération et apportent également des bases d'évaluation de la potentialité des destruxines utilisables contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette *Choristoneura fumiferana*. De plus, comme il a été mis en évidence que les destruxines exercent un effet immunodépresseur sur modèle lépidoptère (Vey *et al.*, 1985) leur utilisation sur le terrain pourrait résulter en une sensibilisation accrue de l'insecte vis-à-vis des infections naturelles de celui-ci, et ainsi en augmenter la mortalité dans la population traitée.

Comme plusieurs exemples dans la littérature relatent la possibilité de synergisme entre insecticides (Benz, 1971), nos efforts se dirigeront notamment vers l'utilisation des destruxines en combinaison avec d'autres insecticides comme le *Bacillus thuringiensis*, ou encore avec des virus comme le virus de la polyédrose cytoplasmique et le virus de la polyédrose nucléaire, et ce, toujours dans la perspective d'utilisation de celles-ci pour lutter contre *Choristoneura fumiferana*.

## REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier les docteurs J.-M. Quiot et A. Vey de la Station de Recherches de Pathologie Comparée de Saint-Christolles-Alès (France) pour leur avoir fourni l'extrait brut de destruxines, monsieur A. Escaut de l'Institut de chimie des substances naturelles de Gif-sur-Yvette (France) pour la fermentation et la préparation de l'extrait, ainsi que monsieur R. McCron de l'Institut pour la Répression des Ravageurs Forestiers du Service Canadien des Forêts (IRRF) pour l'approvisionnement en larves. Les auteurs sont également reconnaissant envers le Dr. J.-M. Quiot pour ses critiques constructives d'une version précédente. Ce projet a été financé en partie par les fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR) du Québec, par le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie (CRSNG) du Canada, et par la Société de Protection des Forêts contre les Insectes et Maladies (SOPFIM) du Québec.

## REFERENCES

- Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* **18**, 265-267.
- Benz, G. 1971. Synergism of micro-organisms and chemical insecticides. In "Microbial Control of Insects and Mites" (H.D. Burges, Ed.), pp. 327-353. Academic Press, New York.
- Dulmage, H.T., Martinez, A.J., et Peva, T. 1976. "Bioassay of *Bacillus thuringiensis* (Berliner)-endotoxin using the tobacco budworm." U.S. Dep. Agric. Tech. Bull. No. 1528.
- Fargues, J., et Robert, P.H. 1986. Potentialités insecticides des destruxines, mycotoxines produites par l'hyphomycète entomopathogène, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor. IVe Congrès sur la Protection de la Santé Humaine et des Cultures en milieu Tropical, pp. 357-362. Marseille, France.
- Fargues, J., Robert, J.H., Vey, A., et Païs, M. 1986. Toxicité relative de la destruxine E pour le lépidoptère *Galleria mellonella*. *C.R. Acad. Sc. Paris*, **303**, série III, 83-86.
- Fast, P.G., et Dimond, J.B. 1984. Susceptibility of larval instars of spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae), to *Bacillus thuringiensis*. *Can. Entomol.* **116**, 131-137.

- Finney, D.J. 1971. "Probit Analysis", 3rd ed. Cambridge University Press, New York.
- Fleming, R.A. 1985. The role of infectious disease in the population dynamics of the spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*). In: "Recent Advances in Spruce Budworms research" (Sanders, C.J., Stark, R.W., Mullins, E.J., and Murphy, J, Eds.), Canadian Forestry Service, 108-109.
- Grisdale, D.G., et Wilson, G.G. 1988. Guidelines for rearing spruce budworm received from the Forest Pest Management Institute. Forest Pest Management Institute, Canadian Forestry Service, Sault Ste. Marie.
- Jegorov, A., Matha, V., et Hradec, H. 1992. Detoxification of destruxins in *Galleria mellonella* L. larvae. *Comp. Biochem. Physiol.* **103C**, 227-229.
- Lange, C., Mulheim, C., Cherton, J.C., Cassier, P., Vey, A., et Païs, M. 1991. Desorption of ions from locust tissues. I. Behaviour of E-destruxin using positive-ion fast-atom bombardment mass spectrometry. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **5**, 169-174.
- Mattson, W.J., Simmons, G.A., et Witter, J.A. 1988. The spruce budworm in Eastern North America. In "Dynamics of Forest Insect Populations" (Alan A. Berryman, Ed.), pp. 309-330. Plenum Press, New York.

- McGaughey, W.H., et Whalon, M.E. 1992. Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Science*, **258**, 1451-1455.
- McGugan, B.M. 1954. Needle- mining habits and larval instars of the spruce budworm. *Can. Entomol.* **136**, 439-448.
- Ministère des Forêts du Québec. 1993. "Rapport annuel 1992-1993: Protection contre les insectes et les maladies" . Les Publications du Québec, Québec.
- Moore, A., et Morris, O.N. 1982. An improved technique for dosing larvae of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae), with measured quantities of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Can. Entomol.* **114**, 89-91
- Quiot, J.M., Vey, A., Vago, C., et Païs, M. 1980. Action antivirale d'une mycotoxine. Etude d'une toxine de l'hyphomycète *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok en culture cellulaire. *C.R. Acad. Sc. Paris.* **291**, 763-766.
- Retnakaran, A., Granett, J., et Ennis, T. 1985. Insect Growth Regulators. *In* "Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology - Insect control" (Kerkut, G.A., and Gilbert, L.I., Ed.), pp.530-601. Pergamon Press, Toronto.



- Roberts, D.W. 1981. Toxins of Entomopathogenic Fungi. *In* "Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980" (H.D. Burges, Ed.), pp. 441-459. Academic Press, New York.
- Samuels, R.I., Reynolds, S.E., et Charnley, A.K. 1988. Calcium channel activation of insect muscle by destruxins, insecticidal compounds produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Comp. Biochem. Physiol.* **90C**, 403-412.
- SPSS-X. 1986. "SPSS-X USER'S GUIDE ", 2nd ed. SPSS inc. McGraw-Hill, New York.
- Vey, A. et Quiot, J.M. 1989. Effet cytotoxique *in vitro* et chez l'insecte hôte des destruxines, toxines cyclodepsipeptidiques produites par le champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae*. *Can. J. Microbiol.* **35**, 1000-1008
- Vey, A., Quiot, J.-M., Vago, C., et Fargues, J. 1985. Effet immunodépresseur de toxines fongiques: inhibition de la réaction d'encapsulation multicellulaire par les destruxines. *C.R. Acad. Sc. Paris.* **300**, série III, 647-651.
- Vey, A., Quiot, J.M., et Vago, C. 1987. Mode d'action insecticide d'une mycotoxine, la Destruxine E, sur les diptères vecteurs et disséminateurs de germes. *C.R. Acad. Sc. Paris.* **304**, Série III, 229-234.

**TABLEAU 1**

Doses létales des destruxines pour différents stades larvaires de *Choristoneura fumiferana*.

Stade	DL 50 <sup>a</sup> (I.C. 95%)	DL 95 <sup>a</sup> (I.C. 95%)	Pente +/- E.S. <sup>b</sup>
III	0.116 (0.103-0.132)	0.414 (0.321-0.592)	2.97 + /- 0.27
IV	0.350 (0.313-0.392)	1.033 (0.857-1.324)	3.50 + /- 0.30*
V	1.520 (1.411-1.640)	4.093 (3.440-5.252)	3.82 + /- 0.37*

<sup>a</sup> Exprimées en  $\mu$  g par larve. Temps: 72h. DL: Dose Létale. I.C.: intervalle de confiance.

<sup>b</sup> Les valeurs suivies par un astérisque indiquent un parallélisme de leur droite de régression selon le test de parallélisme chi-deux ( $P > 0.05$ ). E.S.: erreur standard.

**TABLEAU 2**

Doses létales des destruxines pour différents stades larvaires de *Choristoneura fumiferana* standardisées en fonction du poids corporel moyen des larves

Stade	Poids moyen (mg )	DL 50 <sup>a</sup> (I.C. 95%)	DL 95 <sup>a</sup> (I.C. 95%)
III	1.150	0.098 (0.088-0.108)	0.299 (0.255-0.391)
IV	3.910	0.090 (0.081-0.101)	0.277 (0.238-0.330)
V	14.770	0.103 (0.095-0.112)	0.315 (0.276-0.369)

<sup>a</sup> Exprimées en µg d'extrait brut par mg de poids larvaire moyen. Temps: 72 h. DL: dose létale.

I.C.: intervalle de confiance.

**TABLEAU 3**

Effets des destruxines sur l'évolution des stades larvaires de *Choristoneura fumiferana*

<i>Dose ingérée</i> ( $\mu$ g/larve)	<i>Temps (jours) <sup>ab</sup></i>			
	Stade IV	Stade V	Stade VI	Chrysalide
0	7.78	14.56	20.52	32.47
	6.71-8.83	13.21-15.79	19.31-21.76	31.04-33.88
0.1	9.02	17.91	25.14	35.26
	7.72-10.25	16.76-19.07	24.06-26.26	34.04-36.49

<sup>a</sup> Temps pris par 50% de la population pour atteindre un stade spécifique. Temps zéro: première larve du lot à atteindre le stade IV.

<sup>b</sup> Basé sur l'analyse probit de trois réplicats.

**TABEAU 4**

Effets des destruxines après ingestion (72h) sur la mortalité des larves ainsi que sur le poids et le pourcentage d'émergence de chrysalides chez *Choristoneura fumiferana* placé sur diète fraîche

<i>Dose ingérée</i> ( $\mu\text{g/larve}$ )	<i>Larves</i>	<i>Chrysalides</i>			
	Mortalité <sup>a</sup>	<i>Mâles</i>		<i>Femelles</i>	
		Poids	%Émergence	Poids	%Émergence
0	34.12%	48.79 mg	60.67%	56.42 mg	79.63%
0.1 <sup>b</sup>	38.14%	43.80 mg	61.70%	45.20 mg	64.09%
<i>Probabilité</i> <sup>c</sup>	N.S.	N.S.	N.S.	S.	N.S.

<sup>a</sup> Taux de mortalité des survivants ayant consommé la totalité de la dose à 72 h.

<sup>b</sup> Dose causant approximativement 48% de mortalité (72h).

<sup>c</sup> Signification de la différence entre les moyennes basée sur ANOVA (P<0,05).

N.S.: non significatif. S.: significatif.

## LÉGENDES DES FIGURES

**FIG.1.** Droites de régression probit du taux de mortalité des larves de *Choristoneura fumiferana* en fonction des doses de destruxines utilisées ( $\mu\text{g/larve}$ ).. ○: stade III; □: stade IV; ✕: stade V.

**FIG.2.** Schéma du temps nécessaire aux larves de troisième stade de *Choristoneura fumiferana* pour atteindre les stades larvaires IV (▲), V (○), VI (◆) et le stade chrysalide (□). Pourcentage d'individus rendus à chacun des stades de développement en fonction du temps (jours).

**A :** Larves saines (témoin); **B :** Larves traitées avec  $0.1\mu\text{g}$  de destruxines. Temps zéro: première larve du lot à atteindre le stade larvaire IV. Moyenne de trois réplicats.

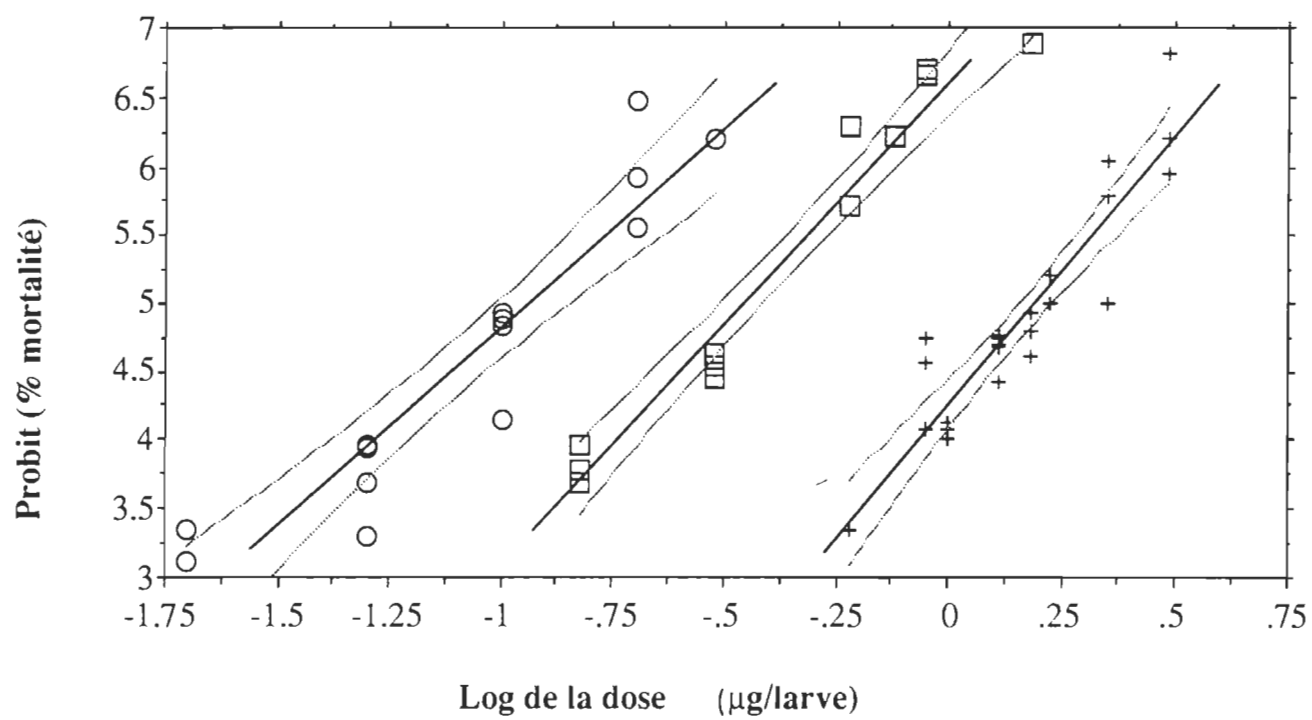


Figure 1

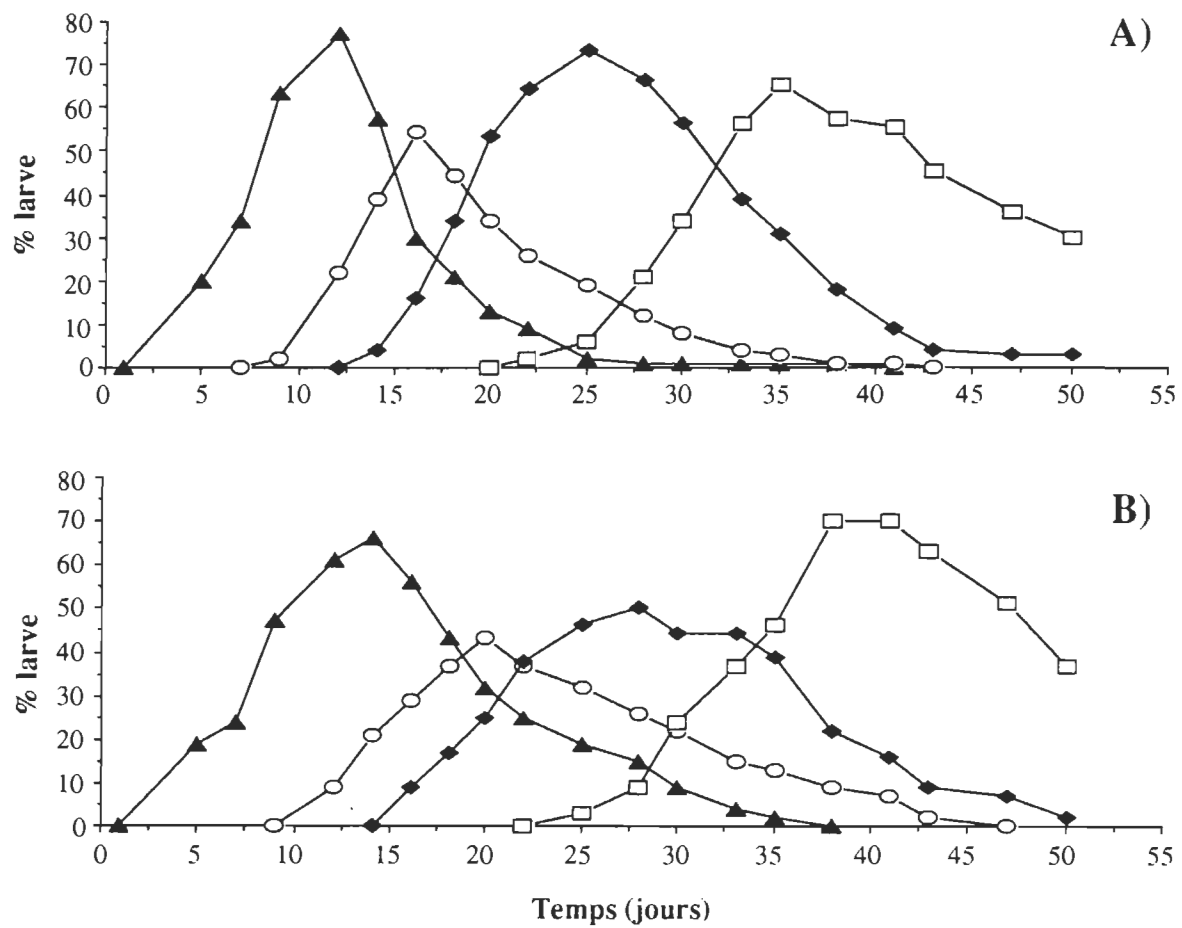


Figure 2





*Journal of Economic Entomology*

*Biological and microbial control*

Guy Charpentier

Département de Chimie-Biologie

Université du Québec à Trois-Rivières

C.P. 500, Trois-Rivières, Québec,

Canada, G9A 5H7

(819) 376-5053

**EFFET DE LA COMBINAISON DU *BACILLUS THURINGIENSIS* ET  
DES DESTRUXINES, MYCOTOXINES DE *METARHIZIUM*  
*ANISOPLIAE*, SUR LA TORDEUSE DES BOURGEONS DE  
L'ÉPINETTE (LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE)**

CHRISTIAN BROUSSEAU<sup>1</sup>, GUY CHARPENTIER<sup>1</sup> et SERGE BELLONCIK<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Département de Chimie-Biologie, Université du Québec à Trois-Rivières, C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7

<sup>2</sup> Centre de Recherche en Virologie, Institut Armand Frappier, Laval-des-Rapides, Québec, Canada, H7V 1B7

## RÉSUMÉ

Des bioessais en laboratoire ont été réalisés afin d'évaluer l'effet de la combinaison d'une préparation commerciale de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Thuricide®) avec les destruxines (mycotoxines de *Metarhizium anisopliae*) sur des larves de cinquième stade de *Choristoneura fumiferana* Clemens. Les doses létales de chaque pathogène ont été évaluées et utilisées comme base pour les bioessais combinés. La présence ou l'absence d'interactions a été déterminée en comparant le taux de mortalité obtenu à celui théoriquement attendu. Dix combinaisons différentes sur dix ont démontré un effet synergique des deux agents, dont sept étant de type supplémentaire. Une modélisation des résultats a également permis d'extraire l'équation générale:  $DI_{\text{mélange}} = 1,259(DI_{Dx}) + 1,129(DI_{Bt}) - 0,016(DI_{Dx})(DI_{Bt}) + 12,196$  expliquant la relation entre les deux pathogènes ( $R^2=0.99$ ). Les résultats suggèrent que les deux agents contribuent au synergisme de ce système et que l'application simultanée de ceux-ci pourrait être un moyen efficace pour contrôler la population de *Choristoneura fumiferana* et diminuer la quantité de *B.t.k.* habituellement nécessaire.

**Mots Clés:** Tordeuse des bourgeons de l'épinette, *Choristoneura fumiferana*, *Metarhizium anisopliae*, destruxines, *Bacillus thuringiensis*, synergisme, contrôle biologique.

## Introduction

Les problèmes environnementaux et de résistance des insectes nuisibles ont grandement favorisé la recherche d'alternatives aux pesticides conventionnels (Carlton et Gonzalez, 1986). La bactérie *Bacillus thuringiensis* (*B.t.*) a particulièrement été étudiée et utilisée pour la fabrication d'insecticides de nouvelle génération. L'avantage premier du *B.t.* est d'être spécifique pour les insectes cibles tout en étant très sécuritaire pour l'homme, les autres mammifères et la faune annexe. Un autre avantage de son utilisation est que le développement de résistance de la part des insectes visés, semble de façon globale, du moins jusqu'à présent, être moins rapide et prononcé que pour les insecticides chimiques. Dans ce cas, c'est la complexité du mécanisme d'action des toxines de *B. thuringiensis* qui serait en cause, impliquant entre-autre déjà du synergisme, du moins pour certaines souches (Tabashnik, 1992b), et nécessitant chez l'insecte d'importantes et multiples mutations génétiques (Carlton et Gonzalez, 1986).

Cependant, l'apparition de résistance, si faible soit-elle, de certains insectes face au *B.t.* est une préoccupation importante, surtout lorsqu'il s'agit d'espèces ayant une grande importance économique. Plusieurs espèces majeures, incluant *Leptinotarsa decemlineata*, *Plodia interpunctella*, et *Plutella xylostella*, ont déjà démontré leur habileté à s'adapter au *B.t.* en laboratoire (McGaughey et Whalon, 1992; Marrone et Macintosh, 1993). *P. xylostella* a par ailleurs aussi développé une importante résistance en nature dans les champs traités régulièrement au *B.t. kurstaki* (Tabashnik *et al.* 1990). On peut donc s'attendre à ce

que la résistance des insectes devienne un problème significatif avec l'intensification de son utilisation.

La tordeuse des bourgeons de l'épinette, *Choristoneura fumiferana* Clemens, est le plus grand défoliateur des forêts de conifères dans le nord-est de l'Amérique du Nord et un insecte économiquement important (Mattson *et al.* 1988). Même si aucune résistance n'a été détectée jusqu'à maintenant chez cet insecte, l'apparition d'un tel phénomène chez certains lépidoptères combinée à l'utilisation sans cesse grandissante du *B.t.k.* pour son contrôle, ne nous permet pas d'écarter cette possibilité à plus ou moins long terme.

La rotation ou l'alternance du *B.t.k.* avec d'autres toxines, insecticides chimiques, ou stratégies de contrôle biologique peut être utilisée pour empêcher ou gérer cette résistance (Marrone et Macintosh, 1993). Le mélange de composés toxiques est aussi un autre moyen relativement simple et efficace. Il a été démontré qu'en général, les mélanges ont vraisemblablement un effet toxique plus prolongé dans le temps par rapport à un seul facteur pathogène pour qui la résistance se développe plus rapidement (McGaughey et Whalon, 1992). Lors de la combinaison de pathogènes, une interaction antagoniste comme synergique peut être retrouvée, rendant ainsi la combinaison plus ou moins efficace pour le contrôle que les agents seuls. Dans le cas du *B.t.*, plusieurs combinaisons entre celui-ci et différents types d'insecticides ou d'agents pathogènes pour les lépidoptères sont retrouvées dans la littérature. Morris (1972) a démontré qu'en fonction de la concentration et de la formulation de l'insecticide biologique et de l'insecticide chimique, de la sensibilité relative des insectes visés face à la bactérie ou l'insecticide appliqué

séparément, de faibles doses de Zectran<sup>®</sup>, phosphamidon et de pyrethrum peuvent augmenter l'efficacité d'une formulation commerciale de *B.t.k.* (Thuricide<sup>®</sup>). Des résultats semblables ont aussi été obtenus en combinant de faibles doses d'organophosphate (fenitrothion, Gardona<sup>®</sup>, Orthene<sup>®</sup>) ou de pyréthroïde synthétique (SBP 1382) avec des doses faibles ou moyennes d'une formulation commerciale à base de *B.t.k.* (Dipel<sup>®</sup>) sur *C. fumiferana* (Morris, 1975). Hamilton et Attia (1977) ont pour leur part démontré que l'utilisation de doses sublétales de binapacryl, tricyclohexyltin hydroxyde, chlordimeform et de fentin hydroxide augmentait le niveau de la CL50 du *B.t.k.* (Dipel<sup>®</sup>) respectivement par un facteur de 5.5, 4.2, 4.2, et 3.7 sur le ravageur *P. xylostella*. Par contre, le demeton-S-methyl et le dimethoate ont été hautement antagonistes avec le *B.t.k.*.

Outre les combinaisons du *B.t.* avec les insecticides chimiques on retrouve entre autre des combinaisons avec des baculovirus, notamment les virus de la polyédrose nucléaire. L'efficacité de telles combinaisons révèle une action soit additive soit antagoniste pour plusieurs ravageurs comme *Trichoplusia ni* (McVay *et al.*, 1977) et *Heliothis virescens* (Bell et Romine, 1980). L'antagonisme entre les deux agents serait surtout attribuable à l'arrêt de la consommation des larves causé par le *B.t.*, prévenant ainsi l'absorption d'une quantité suffisante de virus pour interagir avec celui-ci. Plus récemment, des combinaisons avec des  $\beta$ -exotoxines de *Bacillus thuringiensis* ont suscité beaucoup d'intérêt (Mueller et Harper, 1987; Gardner *et al.*, 1986). Les réponses de ces combinaisons varient de l'antagonisme au synergisme supplémentaire selon le stade larvaire, le temps d'exposition et la concentration de  $\beta$ -exotoxine utilisée. Finalement, on

note quelques essais de combinaisons démontrant de l'antagonisme entre le *B.t.* et des substances du groupe des inhibiteurs de croissance comme le diflubenzuron et l'azadiractine sur les ravageurs *H. virescens* (Mohamed *et al.*, 1983) et *Spodoptera exigua* (Moar et Trumble, 1987), ainsi qu'avec des substances du groupe des inhibiteurs de sérine protéase (inhibiteur de la trypsine et de la trypsine-chymotrypsine) sur *P. xylostella* (Tabashnik *et al.*, 1992a).

Plusieurs modèles existent pour évaluer le synergisme entre différents composés d'un mélange (Finney, 1971; Tabashnik, 1992b). Par ailleurs, Tabashnik (1992b) a démontré que le mauvais choix de modèle chez certains auteurs avait entraîné des conclusions contradictoires entre études semblables.

A part les toxines du *B.t.*, les toxines des champignons entomopathogènes semblent une alternative valable aux insecticides chimiques (Roberts 1981). Parmi celles-ci, les toxines du deutéromycète *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok, principalement les destruxines, semblent très prometteuses (Fargues et Robert, 1986; Roberts, 1981). Ces mycotoxines, qui ne démontrent aucune incompatibilité avec la bactérie *B. thuringiensis* (Boutibonnes *et al.*, 1983), ont récemment été évaluées pour leur toxicité sur *C. fumiferana* (Brousseau *et al.*, soumis pour publication). De plus, une étude effectuée par Lepage *et al.* (1992) a mis en évidence la possibilité d'un certain synergisme entre une destruxine purifiée, la destruxine E, et le *B.t. israelensis* sur des larves de simules en laboratoire.

C'est pourquoi l'objectif premier de cette recherche a été de vérifier si la combinaison de destruxines à un insecticide biologique



commercial, à base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, peut accroître l'efficacité de ce dernier (synergisme), et par le fait même en diminuer la quantité nécessaire pour lutter contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette.

## Matériel et Méthodes

**Insecte.** L'insecte, *Choristoneura fumiferana*, utilisé pour les différents tests *in vivo*, provient de l'Institut pour la Répression des Ravageurs Forestiers (IRRF) du Service Canadien des Forêts à Sault Ste-Marie, Ontario (Canada). Les larves, reçues au deuxième stade en état de diapause, ont été élevées à l'intérieur de chambres environnementales selon les directives de l'IRRF (24°C, 60% humidité, photopériode: 16/8), dans des petits contenants sur diète artificielle (Grisdale et Wilson, 1988) mais sans antibiotique.

**Destruxines.** Nous avons utilisé pour les tests de toxicologie un extrait brut de destruxines sous forme cristallisées. Celui-ci, enregistré sous la référence M.T.C. 2074A, provient de la Station de Recherches de Pathologie Comparée INRA/CNRS de St-Christol-lez-Alès, France. La fermentation et préparation de cet extrait brut ont été réalisées, à partir de la souche Ma.120 de *M. anisopliae*, à l'Institut de chimie des substances naturelles - CNRS de Gif-sur-Yvette (France) par A. Escaut. L'extrait brut est mis en solution dans de l'acétone à raison de 0.1 ml d'acétone pour 7 mg de toxine et dilué avec de l'eau distillée déminéralisée.

***Bacillus thuringiensis.*** La préparation commerciale de *Bacillus thuringiensis* que nous avons choisie est à base de Thuricide® (marque déposée de Sandoz inc.). Ce dernier, composé de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, est connue et utilisé depuis de nombreuses années contre les lépidoptères et tout spécialement la tordeuse des bourgeons de l'épinette. Il provient de la compagnie C.I.L. et sa concentration est de 4000 UI/mg.

**Tests toxicologiques.** Les tests sont effectués sur des larves de cinquième stade. La méthode expérimentale élaborée consiste à déposer sur des petits cubes de diète de 1mm<sup>3</sup>, chacun contenu dans un puits, 2µl de solution toxique à une concentration déterminée. Les puits sont ceux des plaques de culture de cellules à 24 unités (Falcon). Dans le cas des tests combinés, les deux solutions aux diverses concentrations sont d'abord mises en présence l'une de l'autre dans les mêmes proportions pour une période de 1h30, et par la suite testées de la même façon que pour une solution contenant un seul produit. Une fois l'inoculum absorbé, les larves sont déposées une à une dans les puits et ces derniers refermés à l'aide des couvercles. Les plaques sont ensuite entourées de gazes humidifiées, pour maintenir une humidité relative près de 100%, et placées dans une chambre environnementale aux mêmes conditions que l'élevage pendant 72 heures. Après ce délai, la viabilité de chaque insecte est vérifiée et les insectes morts après consommation d'une dose partielle sont inclus dans les relevés sous la présomption que ceux-ci seraient morts s'ils avaient consommé toute la dose. Pour chacun des bioessais une cinquantaine de larves sont utilisées. Avant chaque expérience, un échantillon de 20 larves est prélevé du lot employé, les individus sont

pesés et leurs capsules céphaliques mesurées pour déterminer leur stade afin d'obtenir la plus grande homogénéité possible entre les répétitions. Toutes les expériences sont reprises au moins trois fois.

La détermination des doses létales des deux composés seuls à d'abord été réalisée par la méthode probit en utilisant cinq concentrations différentes par composés. Chaque réplicat d'un bioessai est analysé individuellement et par la suite groupé tel que recommandé par Finney (1971). Les proportions de réponses dans les bioessais sont corrigées en fonction de la mortalité dans les témoins par la formule d'Abbott (1925).

Pour évaluer l'effet de la combinaison entre les destruxines et le *B.t.k.*, les mortalités obtenues sont comparées à l'hypothèse de synergisme indépendant selon la formule  $P = P_{dx} + P_{Bt} (1 - P_{dx}/100)$ , où  $P$  est le pourcentage de mortalité attendu si les deux agents agissent indépendamment l'un de l'autre,  $P_{dx}$  est le pourcentage de mortalité produit par les destruxines seules et  $P_{Bt}$  le pourcentage de mortalité produit par le *B.t.k.* seul (Finney 1971, Mcvay *et al.* 1977, Mueller et Harper 1987). Les résultats d'un test Chi-deux,  $\chi^2 = (O - P)^2/P$ , où  $O$  est la mortalité observée et  $P$  celle attendue, sont comparés aux valeurs tabulaires Chi-deux ( $df=1$ ,  $P<0.05$ ). Une valeur  $\chi^2$  significative indique un effet de synergisme ou d'antagonisme selon que la mortalité observée est plus ou moins élevée que celle attendue, tandis qu'un  $\chi^2$  non-significatif indique une simple action indépendante des deux composés. Lorsque des cas de synergisme sont retrouvés, ils sont subdivisés selon les différents types de synergisme décrits par Benz (1971) soit: *synergisme sous-additif*, lorsque la mortalité observée est inférieure à la somme algébrique des deux

composés seuls; *synergisme supplémentaire*, lorsque la mortalité observée est supérieure à la somme algébrique des deux composés seuls; *synergisme de potentiation*, lorsqu'un des deux composés se trouve en dose sublétales et finalement *action coalitive* dans le cas où les deux composés sont en doses sublétales.

## Résultats

Les droites de régressions dose-mortalité ont tout d'abord été estimées individuellement pour les deux agents seuls sur les larves de cinquième stade. Les Doses Létales 50% (DL50) obtenues pour les deux pathogènes sont de 1.404  $\mu$ g/larve (pente = 2.719) pour les destruxines et de 0.588 U.I./larve (pente = 3.431) pour le *B.t.k.*. On retrouve également au tableau 1 l'estimation de certaines autres doses létales obtenues lors de ces bioessais.

Les doses calculées à partir des essais individuels ont servi comme base pour les traitements simultanés des larves avec les deux agents. Dix combinaisons différentes ont été testées en essayant d'avoir une plus grande diversité possible de combinaisons. Les doses utilisées pour les deux pathogènes causent seules des mortalités variant entre 1% et 83%, ces réponses sont par ailleurs similaires à celles obtenues lors des bioessais initiaux (tableau 1 et 2).

On remarque que sur les 10 combinaisons effectuées aucune ne démontre d'effets antagonistes entre les composés (tableau 2). De plus, dans 7 cas de combinaison la mortalité observée du mélange est significativement plus importante que celle théoriquement attendue,

en se basant sur une action indépendante des agents, et également supérieure à la somme algébrique des effets des agents seuls, démontrant ainsi qu'il y aurait pour ces combinaisons un effet de synergisme de type supplémentaire entre les destruxines et le *B.t.k.*. Les trois autres combinaisons montrent pour leur part un synergisme de type indépendant entre les agents. Ce type de réponse semble survenir surtout lorsque la dose utilisée de l'un ou des deux composés cause à elle seule une mortalité supérieure à 60% et tout particulièrement lorsque la somme algébrique des effets des deux composés seuls est supérieure à 100%. Les résultats issus de la combinaison de doses provoquant de très faible taux de mortalité indiqueraient pour leur part qu'il y aurait possiblement une certaine action coalitive entre les deux agents et également un certain effet de potentiation (tableau 2).

Afin d'effectuer une meilleure analyse des résultats et également pour déterminer plus précisément le rôle de chacun des composés du mélange dans la mortalité finale, une modélisation, à partir des données acquises lors des tests combinés, a été réalisée en utilisant le modèle quadratique. On retrouve à la figure 1 la représentation graphique des mortalités prédites par le modèle en fonction des diverses doses létales utilisées de chacun des agents dans le mélange. Par exemple, le modèle prédit que la combinaison d'une dose de destruxines causant 20% de mortalité avec une dose de *B.t.k.* causant également 20% de mortalité provoquerait chez les larves de cinquième stade de *Choristoneura fumiferana* une mortalité de l'ordre de 55%. De plus, le modèle prédit, comme les tests de combinaison le laissaient

envisager, une action coalitive des produits, de l'ordre de 12%, lorsque ceux-ci seraient utilisés en doses sublétales et un effet de potentiation lorsque seulement l'un des deux serait en dose sublétales.

L'équation associée au modèle est une équation quadratique de base simplifiée sous la forme  $DI_m = a(DI_{Dx}) + b(DI_{Bt}) + c(DI_{Dx})(DI_{Bt}) + f$ , où  $DI_m$  est le taux de mortalité prédit causé par le mélange,  $DI_{Dx}$  le taux de mortalité causé par la dose de destruxines incorporée au mélange lorsqu'utilisée seule et  $DI_{Bt}$  le taux de mortalité causé par la dose de *B.t.k.* incorporée au mélange lorsqu'utilisée seule. La simplification de l'équation d'origine sous cette forme a permis une interprétation beaucoup plus facile du rôle de chacune des composantes tout en conservant un très bon  $R^2$  de 0.99. La valeur des variables alliées à chacun des termes ainsi que l'erreur standard associée et les intervalles de confiance à 95% sont indiqués au tableau 3. On remarque que la constante associée aux destruxines est légèrement supérieure à celle du *B.t.k.* mais n'en demeure pas moins semblable avec des intervalles de confiance se recoupant. Il semblerait donc qu'en fait les destruxines et le *B.t.k.* contribuent également au modèle. Ce qui tend à signifier que les deux pathogènes, à valeur égale, auraient sensiblement la même importance dans le taux de mortalité des larves soumises au mélange de ceux-ci. Pour ce qui est de la constante associée à la combinaison des deux, celle-ci étant négative, indiquerait qu'il y aurait théoriquement une influence négative de la combinaison des deux agents sur le modèle. Cette observation d'effet antagoniste théorique entre les composés est cependant minimisée par le fait que la valeur attribuée à cette constante soit très faible (0.016), n'influençant ainsi véritablement le modèle que lorsque de fortes

doses létales sont utilisées, mais même dans ce cas, jamais suffisamment pour produire une réponse antagoniste globale du modèle. Finalement, la dernière constante qui est celle associée au modèle permet de déterminer l'ampleur possible de l'action coalitive et du synergisme de potentiatio n entre les composés.

## Discussion

L'utilisation du modèle quadratique pour tenter d'expliquer la relation entre les deux pathogènes se justifie en elle-même par la ressemblance entre le type de réponse biologique observée lors des tests de combinaison et les effets prédits par ce modèle. D'ailleurs, le choix et l'exactitude de celui-ci se confirme lorsque l'on compare la mortalité prédite par le modèle et celle réellement obtenue pour les dix combinaisons effectuées (tableau 4 et figure 2). En effet, les mortalités prédites et observées sont très près les unes des autres et la différence entre les deux résulte en des résidus relativement faibles n'ayant aucune relation apparente avec l'augmentation du taux de mortalité (tableau 4). De plus, la relation entre la mortalité prédite et observée est sensiblement bien linéaire avec un facteur proche de 1:1 (figure 2).

Nos résultats démontrent, aussi bien par les tests de combinaisons que par le modèle théorique, que plus les doses létales utilisées pour chacun des composés sont importantes, plus le synergisme retrouvé est faible et se rapproche du synergisme de type

indépendant. Cette diminution du synergisme, également reliée à la valeur négative de la constante associée à la combinaison des deux agents que l'on retrouve dans le modèle théorique, s'expliquerait selon nous par le plafonnement de la mortalité à une valeur de 100%, et non pas, comme le laisserait penser le modèle, à une action antagoniste des destruxines et du *B.t.k.* lorsque combinés à fortes doses. Il est évident que plus on augmente les doses létales de chacun, plus on se rapproche de cette limite et conséquemment plus la différence entre le taux de mortalité obtenue par le mélange et celui attendu sera faible et que la réponse s'approchera d'un synergisme indépendant.

Il est clair selon nos résultats que dans les conditions de cette expérience, les destruxines et la formulation commerciale à base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* se synergisent l'un par rapport à l'autre lorsqu'utilisés contre *C. fumiferana*. Ceci est évident lorsque l'on compare la mortalité lors des bioessais des combinaisons de doses létales de destruxines et de *B.t.k.* respectivement de 15% + 40% et 40% + 15%, aussi bien que dans les taux de mortalités des différentes combinaisons réciproques prédits par le modèle (tableau 2 et figure 1). Dans les deux cas, les taux de mortalité des combinaisons réciproques sont semblables. Ceci est également évident lorsqu'on compare la valeur accordée à chacun des deux agents dans l'équation du modèle. Si l'un des deux avait été plus actif en tant qu'agent synergique, alors la valeur associée à celui-ci aurait été probablement plus importante que celle de l'agent synergisé. Il est difficile cependant d'émettre des hypothèses en ce qui a trait à l'interaction possible au niveau biologique des deux pathogènes, et le fait que le mécanisme par lequel les destruxines agissent soit encore obscur rend la tâche



particulièrement ardue. Par contre, comme il a été mentionné la ressemblance entre l'action des destruxines et celles des toxines du *B.t.* (Vey *et al.*, 1987; Brousseau *et al.*, en préparation), les résultats obtenus lors de cette étude, ne démontrant à priori aucun signe de compétition entre les agents, semblent exclure la possibilité que dans l'éventualité où l'action initiale des destruxines se situerait au niveau de l'épithélium intestinal via des récepteurs spécifiques, que ceux-ci soient les mêmes que ceux impliqués avec les cristaux protéiques du *B.t.k.*.

Cette étude en laboratoire suggère donc que dans les conditions utilisées l'application simultanée des destruxines et d'une solution commerciale à base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* peut accroître l'efficacité de chacun des produits et par le fait même en diminuer la quantité nécessaire pour lutter contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette. Ceci confirme et approfondit les premières observations de Lepage *et al.* (1992) sur la possibilité d'un certain synergisme entre les destruxines et le *B. thuringiensis israelensis* sur des larves de simules en laboratoire et démontre que ce synergisme est possible pour différentes souches de *B.t.* et sur différents insectes cibles. La question restant à élucider est de savoir si dans des conditions de terrain l'application simultanée de ces deux pathogènes résulterait à des réponses semblables à celles obtenues en laboratoire. Dans l'affirmative, l'élaboration d'un modèle de prédiction tel que celui décrit dans cette étude pourrait être un outil très intéressant. En effet, un tel modèle permettrait de déterminer en fonction des coûts de production de chacun des produits et des objectifs fixés quelles

combinaisons seraient les plus avantageuses et les plus appropriées dans ces circonstances.

## Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier les docteurs J.-M. Quiot et A. Vey de la Station de Recherches de Pathologie Comparée de Saint-Christolles-Alès (France) pour leur avoir fourni l'extrait brut de destruxines, monsieur A. Escaut de l'Institut de chimie des substances naturelles de Gif-sur-Yvette (France) pour la fermentation et la préparation de l'extrait, ainsi que monsieur R. McCron de l'Institut pour la Répression des Ravageurs Forestiers (IRRF) du Service Canadien des Forêts à Sault Ste-Marie pour l'approvisionnement en larves. Ce projet a été financé en partie par les fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR) du Québec, par le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie (CRSNG) du Canada, et par la Société de Protection des Forêts contre les Insectes et Maladies (SOPFIM) du Québec.

## Références

- Abbott, W.S. 1925.** A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18: 265-267.
- Bell, M.R. & C.L. Romine. 1980.** Tobacco budworm field evaluation of microbial control in cotton using *Bacillus thuringiensis* and nuclear polyhedrosis virus with a feeding adjuvant. J. Econ. Entomol. 73: 427-430.
- Benz, G. 1971.** Synergism of micro-organisms and chemical insecticides, pp. 327-353. In H. D. Burges [ed.], Microbial Control of Insects and Mites. Academic Press, New-York.
- Boutibonnes, P., C. Malherbe, W. Kogbo & C. Marais. 1983.** Propriétés antibactériennes de 49 mycotoxines vis-à-vis de *Bacillus thuringiensis*. Microbiologie-Aliments-Nutrition, 1: 259-264.
- Brousseau, C, G. Charpentier & S. Belloncick.** Susceptibility of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* Clemens, to destruxins (mycotoxins of *Metarhizium anisopliae*). J. Invertebr. Pathol. (en préparation).

**Carlton, B.C. & J.M. Gonzalez. 1986.** Biocontrol of insects - *Bacillus thuringiensis*, pp. 253-272. *In* Proceedings, P. C. Augustine, H. D. Danforth & M. R. Bakst [eds.], Beltsville symposia in agricultural research: Biotechnology for solving agricultural problems. Martinus Nijhoff Publishers, Boston (USA).

**Fargues, J. & P.H. Robert. 1986.** Potentialités insecticides des destruxines, mycotoxines produites par l'hyphomycète entomopathogène, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor, pp. 357-362. *In* Proceedings, IVe Congrès sur la Protection de la Santé Humaine et des Cultures en milieu Tropical. Marseille, France.

**Finney, D.J. 1971.** "Probit Analysis". Cambridge University Press, London.

**Gardner, W.A., A.F. Pendley & G.K. Stokey. 1986.** Interactions between *Bacillus thuringiensis* and its beta-exotoxin in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) neonate larvae. Florida Entomol. 69: 531-536.

**Grisdale, D.G. & G.G. Wilson. 1988.** Guidelines for rearing spruce budworm received from the Forest Pest Management Institute. Forest Pest Management Institute, Canadian Forestry Service, Sault Ste. Marie.

- Hamilton, J.T. & F.I. Attia. 1977.** Effects of mixtures of *Bacillus thuringiensis* and pesticides on *Plutella xylostella* and the parasite *Thyraeella collaris*. J. Econ. Entomol. 70: 146-148
- Lepage, L., G. Charpentier, D. Pecqueur, A. Vey & J.-M. Quiot. 1992.** Utilisation des toxines de champignons entomopathogènes dans la lutte contre les diptères piqueurs. Mem. Soc. r. belge Ent. 35: 139-143.
- Marrone, P.G. & S.C. Macintosh. 1993.** Resistance to *Bacillus thuringiensis* and resistance management, pp. 221-235. In P. F. Entwistle, J. S. Cory, M. J. Bailey & S. Higgs [eds.], *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: Theory and Practice. John Wiley & Sons Ltd, USA.
- Mattson, W.J., G.A. Simmons & J.A. Witter. 1988.** The spruce budworm in Eastern North America, pp. 309-330. In Alan A. Berryman [ed.], Dynamics of Forest Insect Populations. Plenum Press, New-York.
- McGaughey, W.H. & M.E. Whalon. 1992.** Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. Science, 258: 1451-1455.
- McVay, J.R., R.T. Gudauskas & J.D. Harper. 1977.** Effects of *Bacillus thuringiensis* nuclear-polyhedrosis virus mixtures on *Trichoplusia ni* larvae. J. Invertebr. Pathol. 29: 367-372.

- Moar, W.J. & J.T. Trumble. 1987.** Toxicity, joint action, and mean time of mortality of Dipel 2X, avermectin B1, neem and thuringiensin against beet armyworms (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. 80: 588-592.
- Mohamed, A.I., S.Y. Young & W.C. Yearian. 1983.** Susceptibility of *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae to microbial agent-chemical pesticide mixtures on cotton foliage. Env. Entomol. 12: 1403-1405.
- Morris, O.N. 1972.** Susceptibility of some forest insects to mixtures of commercial *Bacillus thuringiensis* and chemical insecticides, and sensitivity of the pathogen to the insecticides. Can. Entomol. 104: 1419-1425.
- Morris, O.N. 1975.** Susceptibility of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*, and the white-marked tussock moth, *Orgyia leucostigmata*, to *Bacillus thuringiensis*: chemical insecticide combinations. J. Invertebr. Pathol. 26:193-198.
- Mueller, M.D. & J.D. Harper 1987.** Interactions between a commercial preparation of *Bacillus thuringiensis* and  $\beta$ -exotoxin in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. J. Invertebr. Pathol. 50: 201-206.

**Roberts, D.W. 1981.** Toxins of entomopathogenic fungi, pp. 441-459.  
*In* H.D. Burges [ed.], Microbial Control of Pests and Plant Diseases  
1970-1980. Academic Press, New-York.

**Tabashnik, B.E. 1992b.** Evaluation of synergism among *Bacillus thuringiensis* toxins. Appl. Environ. Microbiol. 58 (10): 3343-3346.

**Tabashnik, B.E., N. Finson & M.W. Johnson. 1992a.** Two protease inhibitors fail to synergize *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). J. Econ. Entomol. 85: 2082-2087.

**Tabashnik, B.E., N.L. Cushing, N. Finson & M.W. Johnson. 1990.** Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). J. Econ. Entomol. 83: 1671-1676.

**Vey, A, J.M. Quiot & C. Vago. 1987.** Mode d'action insecticide d'une mycotoxine, la destruxine E, sur les diptères vecteurs et disséminateurs de germes. C.R. Acad. Sc. Paris. 304(III): 229-234.



**Tableau 1. Doses létales des destruxines et du *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* sur les larves de stade V de *Choristoneura fumiferana*.**

Doses létales <sup>a</sup>	Doses <sup>b</sup>	Intervalles de confiance 95%
<i>B. thuringiensis</i> <i>kurstaki</i>		
10	0.248	0.175 - 0.302
30	0.414	0.354 - 0.465
50	0.588	0.522 - 0.694
70	0.836	0.706 - 1.127
90	1.390	1.052 - 2.354
Destruxines		
10	0.475	0.397 - 0.543
30	0.901	0.820 - 0.982
50	1.404	1.280 - 1.569
70	2.190	1.916 - 2.611
90	4.159	3.361 - 5.564

<sup>a</sup> Basé sur l'analyse probit des mortalités obtenues lors des bioessais. Cinq concentrations par bioessai, trois réplicats par concentration.

<sup>b</sup> Dose exprimé en U.I./larve pour le *B. thuringiensis kurstaki* et en µg/larve pour les destruxines.

**Tableau 2. Effets de la combinaison des destruxines et du *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* sur les larves de stade V de *Choristoneura fumiferana*.**

Destruxines		<i>B.t. kurstaki</i>		Combiné		$\chi^2$ <sup>c</sup>	Effets observés
Dose ( $\mu$ g/larve)	% Mortalité <sup>a</sup>	Dose (U.I./larve)	% Mortalité <sup>a</sup>	% Mortalité observée <sup>a</sup>	% Mortalité attendue <sup>a</sup>		
0.300	4.66	0.095	1.20	17.12	4.08	s.	S. suppl.
0.500	12.23	0.095	2.03	28.94	14.01	s.	S. suppl.
0.500	10.84	0.550	60.77	79.92	65.04	n.s.	S. indep.
0.675	13.45	0.525	40.40	71.78	48.38	s.	S. suppl.
1.000	18.87	0.525	39.42	71.66	50.85	s.	S. suppl.
1.275	42.19	0.390	15.44	72.60	51.12	s.	S. suppl.
1.275	38.30	0.525	41.16	79.98	63.69	s.	S. suppl.
1.500	53.13 <sup>b</sup>	0.690	83.28 <sup>b</sup>	100.00 <sup>b</sup>	92.14 <sup>b</sup>	n.s.	S. indep.
1.650	55.09	0.525	40.36	90.05	73.22	s.	S. suppl.
2.100	82.97 <sup>b</sup>	0.690	83.28 <sup>b</sup>	100.00 <sup>b</sup>	97.15 <sup>b</sup>	n.s.	S. indep.

<sup>a</sup> Moyenne de trois réplicats

<sup>b</sup> Moyenne de deux réplicats

<sup>c</sup> Test  $\chi^2$  (dl=1, P<0.05). s.: significatif ; n.s.: non-significatif

**TABLEAU 3. Estimations des valeurs des constantes de l'équation théorique  $Dl_m = a(Dl_{Dx}) + b(Dl_{Bt}) + c(Dl_{Dx})(Dl_{Bt}) + f$ .**

Constante	Estimation <sup>a</sup>	E.S.A.	I.C. 95%
a	1.259	0.110	0.991 ; 1.527
b	1.129	0.071	0.954 ; 1.304
c	-0.016	0.002	-0.020 ; -0.012
f	12.196	3.002	4.850 ; 19.542

<sup>a</sup>  $R^2 = 0.99$ . E.S.A.: Erreur Standard Associé. I.C.: Intervalle de Confiance.

**TABLEAU 4. Comparaison entre le taux de mortalité prédit par le modèle théorique et celui observé pour dix combinaisons différentes entre les destruxines et le *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*.**

% Mortalité prédite <sup>a</sup>	% Mortalité observée <sup>a</sup>	résidu
20.771	17.12	-3.651
29.638	28.94	-0.698
66.951	71.78	+4.829
69.172	71.66	+2.488
69.681	72.60	+2.919
80.584	79.92	-0.664
80.715	79.98	-0.735
89.419	90.05	+0.631
92.072 <sup>b</sup>	100.00 <sup>b</sup>	+7.928
92.598 <sup>b</sup>	100.00 <sup>b</sup>	+7.402

<sup>a</sup> Moyenne de trois réplicats

<sup>b</sup> Moyenne de deux réplicats

## Légende des figures

FIG.1. Shéma des taux de mortalité prédits par le modèle théorique pour les combinaisons de diverses doses létales de destruxines et de *Bacillus thuringiensis*. var. *kurstaki*.

FIG.2. Relation entre la mortalité prédite par le modèle théorique et celle observée pour dix combinaisons différentes entre les destruxines et le *Bacillus thuringiensis*. var. *kurstaki*.

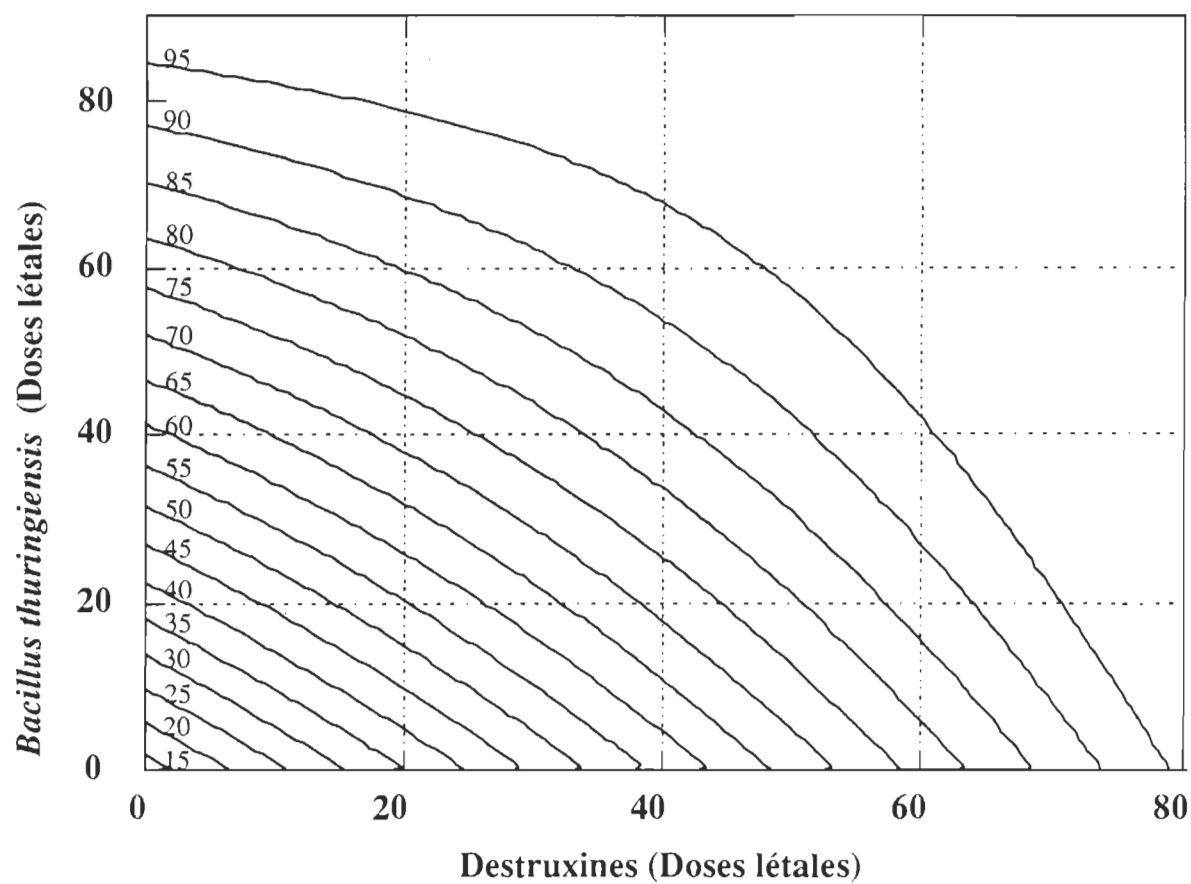


Figure 1

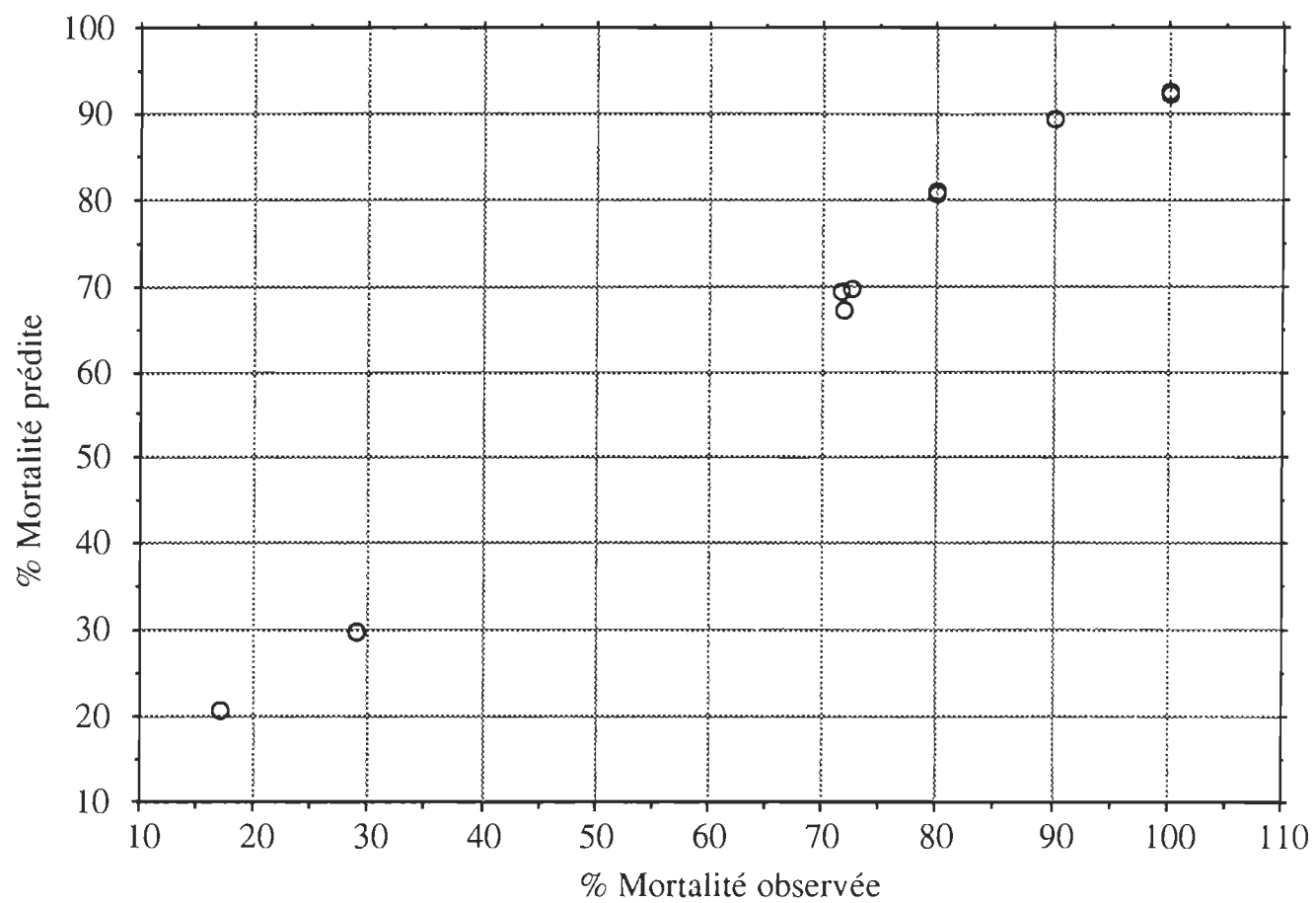


Figure 2

Section: *Biological and microbial control*

Titre abrégé: Combinaison des destruxines et du *B.t.k.* contre *C .  
fumiferana*.